

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza

Studijní obor: Klinická a toxikologická analýza



Simona Šilhavcká

ANALÝZA VZORKŮ S KOMPLEXNÍ MATRICÍ METODOU KOMPREHENZIVNÍ PLYNOVÉ CHROMATOGRAFIE

Analysis of samples with complex matrix by comprehensive
gas chromatography

Bakalářská práce

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Radomír Čabala, Dr.

Praha 2015

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu v Praze je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 1. května 2015.

Abstrakt:

Komprehenzivní plynová chromatografie (GC×GC) je technika vhodná pro separaci komplikovaných organických směsí a nabízí mnoho výhod oproti běžné plynové chromatografii. Umožňuje kompletní analýzu vzorku současně na dvou odlišných kolonách, mezi kterými je rozhraní nazvané modulátor.

Byla provedena analýza dvou éterických levandulových olejů a extraktu z levandule pomocí plynového chromatografu s pulzním tlakovým modulátorem a dvojicí detektorů: plamenově ionizačním detektorem a hmotnostním spektrometrem.

Pro efektivní separaci vybraných olejů byly nalezeny optimální podmínky. Vstupní tlak na kolonu byl 250 kPa, první a druhý tlak nastavený na modulátoru byl 155 kPa a 175 kPa. Byl zvolen pomalejší teplotní program s počáteční teplotou 70 °C a nárůstem teploty 2 °C/min. Jako vhodná se ukázala modulační perioda v délce 5 s a s pulzem trvajícím 300 ms.

Analyty byly identifikovány podle jejich hmotnostních spekter z MS detektoru. Nejvíce zastoupenými látkami v levandulových olejích byly terpeny. Složení levandulových olejů se liší v závislosti na druhu levandule, podmínkách pěstování i způsobu přípravy oleje.

Klíčová slova:

komprehenzivní plynová chromatografie, pulzní tlakový modulátor, levandulový olej

Obsah

1 Úvod	6
2 Teoretická část.....	7
2.1 Multidimenzionální techniky	7
2.2 Komprehenzivní plynová chromatografie	7
2.3 Separace	8
2.4 Modulace.....	9
2.5 Detekce.....	11
2.6 Využití.....	11
2.7 Levandulový olej.....	12
3 Experimentální část	14
3.1 Chemikálie	14
3.2 Přístrojové vybavení	14
3.3 Podmínky analýzy	15
3.4 Vyhodnocení	15
4 Výsledky a diskuze.....	16
4.1 Optimalizace	16
4.1.1 Volba tlaků.....	16
4.1.2 Modulační perioda	17
4.1.3 Teplotní program	18
4.2 Levandulové oleje	19
5 Závěr.....	27
6 Literatura	29

Seznam zkratk a symbolů

1D-GC - jednorozměrná plynová chromatografie

2D - dvourozměrný (prostor)

2D-GC - dvourozměrná plynová chromatografie

3D - třírozměrný (prostor)

a.u. - arbitrary unit

GC - plynová chromatografie

GC×GC - komprehenzivní plynová chromatografie

GC×GC-FID - komprehenzivní plynová chromatografie s plamenově ionizačním detektorem

GC×GC-TOF-MS - komprehenzivní plynová chromatografie s time-of-flight hmotnostním detektorem

MDGC - multidimenzionální plynová chromatografie

MS - hmotnostní spektrometr

m/z – poměr hmotnosti a náboje ionizované částice

n – píkova kapacita

PFM - pulzní tlakový modulátor

qMS - kvadrupólový hmotnostní spektrometr

t - čas [min, s, ms,]

t_R - retenční čas [min]

TIC - total ion current

TOF-MS - průletový hmotnostní detektor

1 Úvod

Tématem bakalářské práce je analýza vzorků s komplexní matricí metodou komprehenzivní plynové chromatografie. Tato metoda je vhodná pro analýzu velmi složitých a komplexních vzorků jako jsou např. ropné produkty či přírodní vonné oleje. Umožňuje separaci celého vzorku na dvou sériově zapojených odlišných kolonách, mezi kterými je rozhraní nazvané modulátor.

Všechna měření byla provedena na plynovém chromatografu s pulzním tlakovým modulátorem. Detekce byla provedena pomocí plamenově ionizačního detektoru a hmotnostního spektrometru.

Pro analýzu byly vybrány dva éterické oleje obsahující levandulovou esenci a přírodní extrakt z levandule. Éterické oleje mohou být klasifikovány jako středně až vysoce komplexní vzorky, které obsahují celou řadu různých sloučenin.

Cílem práce je nalezení optimálních podmínek pro komprehenzivní plynovou chromatografii pro separaci levandulových olejů a identifikace nalezených látek.

2 Teoretická část

2.1 Multidimenzionální techniky

Při analýze těkavých látek a plynů v reálných komplexních vzorcích jako jsou např. petrochemické produkty nebo polutanty v životním prostředí je klasická plynová chromatografie (1D-GC) často nedostatečným separačním nástrojem. Některé analyty nelze během jedné analýzy pro jejich podobné vlastnosti rozdělit a v chromatogramu se objevují buď překrývající se či nedostatečně rozdělené píky. Jeden ze způsobů jak efektivně zlepšit separaci je použití více separačních mechanismů jako je tomu například u multidimenzionální plynové chromatografie.¹

Její podstatou je využití více postupných separací v plynné fázi na základě různých mechanismů. Metodou využívající zapojení dvou kolon je např. heart-cut technika. Ta umožňuje část vzorku, který byl rozseparován na první koloně, rozdělit na další koloně o jiné selektivitě. Avšak pouze několik frakcí vzorku eluujících z prvních kolony je možné přenést na druhou kolonu, kde jsou dále separovány. Heart-cut technika je časově náročná a může být využita pouze pro izolaci vybraných komponent v komplexní směsi a analýzu několika cílených složek vzorku.²

2.2 Komprehenzivní plynová chromatografie

Rozšířením heart-cut techniky se vyvinula komprehenzivní plynová chromatografie (GC×GC), která je vhodnou metodou pro kompletní analýzu vzorku. Umožňuje separaci celého vzorku na dvou odlišných kolonách, mezi kterými je rozhraní nazvané modulátor.³

GC×GC je metoda vhodná pro analýzu velmi složitých a komplexních vzorků, které mohou obsahovat stovky i tisíce jednotlivých komponent, jako např. v případech ropných produktů. Tato technika byla poprvé úspěšně popsána v roce 1991 Phillipsem s použitím dvou kolon, mezi kterými byl termální modulátor.⁴

Hlavní předností GC×GC oproti 1D-GC je obrovský vzrůst píkovej kapacity, čehož se často využívá k analýzám komplexních směsí, kde klasická 1D-GC nelze využít. Píková kapacita je definována jako maximální počet píků oddělených s předem definovaným rozlišením, které dokáže systém separovat a její teoretická hodnota zde

vzroste z n (píková kapacita jedné kolony) na $n = n_1 \cdot n_2$ (součin píkových kapacit první a druhé kolony), čímž se zvýší účinnost separace až o několik řádů. Další výhodou GC×GC systému je zvýšení intenzity signálu a tím citlivosti detekce. Důsledkem modulace dochází k rozdělení píku vycházejícího z první kolony na určitý počet velmi úzkých píků (obvykle 50-600 ms šířky při základní linii podle modulační periody). Jelikož plocha nemodulovaných píků a součet ploch modulovaných píků musí mít stejnou hodnotu, dojde zúžením píků k nárůstu jejich výšky. Vzniká tedy několikanásobně vyšší poměr signál/šum.⁵

Výsledkem GC×GC separace je klasický chromatogram, který je nutné pro další vyhodnocení převést na konturový graf speciálním softwarem. Zde jsou analyty zobrazeny tak, že na ose x je retenční čas na první koloně v minutách, na ose y retenční čas na druhé koloně v sekundách a osa z představuje odezvu detektoru zobrazenou do vrstevnic.⁶

Výška píku je charakterizována vrstevnatým konturovým objektem (blobem), který po převedení do trojrozměrného prostoru představuje tvar kužele a jehož objem udává množství daného analytu. Oproti klasickým chromatogramům mají konturové grafy tu výhodu, že díky charakteristickému uspořádání blobů (analytů) v prostoru lze získat hodnotné informace o struktuře analyzované látky.⁷ Více k tomuto problému uvedeno v kapitole Separace.

Optimalizace GC×GC systému však vyžaduje odlišný a více komplexní přístup než u 1D-GC. Například teplota a průtok nosného plynu ovlivní separaci v obou kolonách odlišně. Dále musí být zahrnuty nové parametry, jako je modulační perioda a tlaky v kolonách a kapilárách, které musí být optimalizovány.^{8,9}

2.3 Separace

Vzorek je separován na dvou různých kolonách s odlišnou stacionární fází. Dochází k rozdělení analytů na základě dvou různých mechanismů separace, a tudíž dva různé analyty by měly mít hodnoty retenčních časů v každé dimenzi vzájemně nezávislé (nekorelující). Tento jev označujeme jako ortogonalita.

První separace obvykle probíhá na delší nepolární koloně využívající pomalejší teplotní program (1-5 °C/min). Na této nepolární koloně jsou analyty separovány

hlavně podle jejich bodu varu, tak jako by byly v klasické 1D-GC. Druhá kolona je obvykle kratší a středně až silně polární. Separace na druhé koloně probíhá mnohem rychleji než na první (20 ml/min oproti 1 ml/min) a probíhá v podstatě za izotermálních podmínek. Vzhledem k tomu, že všechny koeluuující analyty z první kolony mají blízký bod varu, při nadávkování do druhé kolony závisí jejich separace na interakci s polární stacionární fází (dělení dle polarity). V některých systémech může být druhá kolona umístěna ve svém vlastním termostatu a tak může být nastavení teploty v každé části chromatografu do určité míry nezávislé a flexibilní.¹⁰

2.4 Modulace

Nejdůležitější součástí GC×GC systému je modulátor, který spojuje obě kolony. Musí zajistit, aby byla analýza kontinuální a nedošlo při dávkování vzorku na druhou kolonu ke znehodnocení separace dosažené na první koloně. Funkcí modulátoru je zachytit malou frakci analytu z první kolony a následně ho rychle nadávkovat do druhé kolony. Tento čas spolu s časem separace na druhé koloně se nazývá modulační perioda a obvykle je v rozmezí 1-8 s.¹¹

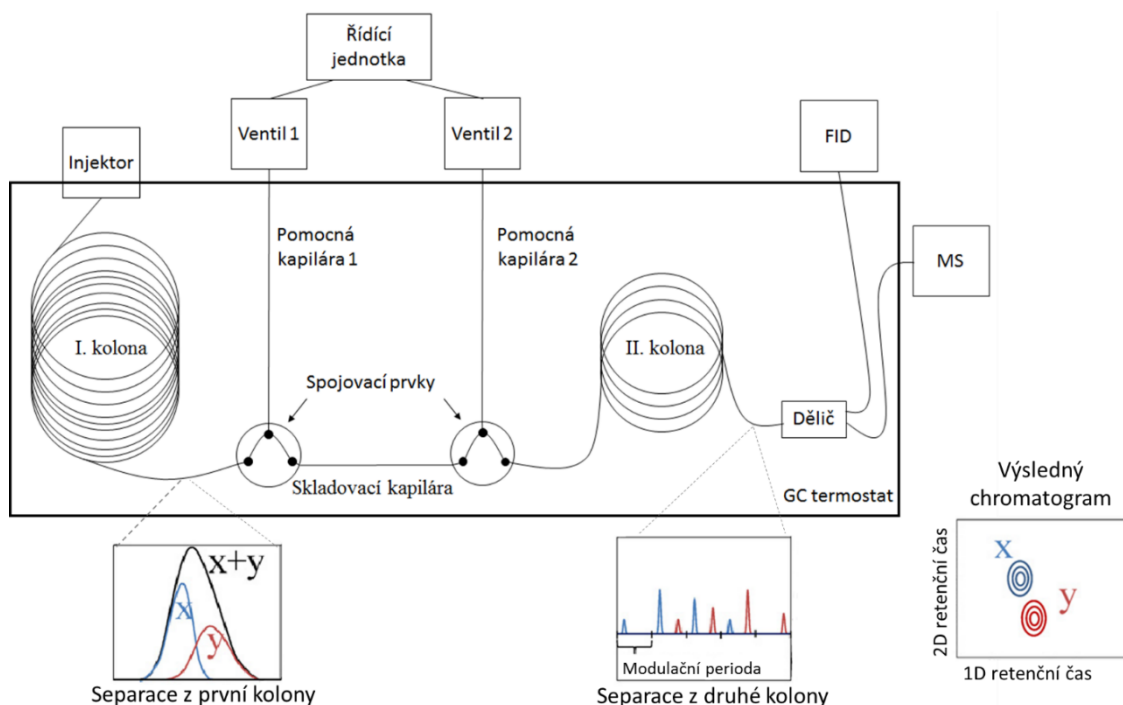
Separace na druhé koloně musí být dokončena v rámci jedné modulační periody, a proto retenční čas jakéhokoliv analytu na druhé koloně musí být menší než modulační perioda. V případě, že tomu tak není, dochází k nechtěnému wrap-around efektu. Ten ovšem nemusí být vždy nežádoucí a lze ho někdy i prakticky využít, jen se s ním musí počítat. Pro splnění podmínky optimální modulace by měly být píky v první dimenzi poněkud širší (2 až 5 s) tak, aby docházelo 3 – 4 krát k jejich modulaci.¹²

Modulátory můžeme rozdělit do dvou základních skupin na termální a tlakové podle toho, na jakém principu jsou založeny. Mezi nejčastěji využívané modulátory patří kryogenní pro jejich vysokou účinnost modulace (dávkování). Jejich hlavní předností je schopnost produkovat velmi úzké píky v chromatogramu (okolo 60 ms šířky píku v polovině výšky), která je nezbytná pro dosažení vysoké účinnosti systému. Tyto modulátory využívají principu kryofokusace pomocí kapalného dusíku. Levnější variantou je použití kapalného oxidu uhličitého, ale teplota kapalného CO₂ je přibližně -70 °C a je nedostatečná k účinnému zachycení nejvíce těkavých látek. K zachycení analytu dochází ve smyčce z kapiláry díky zchlazení malého bodu této kapiláry tryskou

s chladícím médiem. Opětovné uvolnění a tím dávkování do druhé kolony je umožněno rychlým ohřátím tohoto bodu horkým pulsem pomocného plynu o vysoké teplotě (350 °C). Nevýhodou jsou vysoké pořizovací a provozní náklady kvůli velké spotřebě kryogenních plynů.^{13,14}

Druhou skupinou jsou modulátory tlakové, které využívají přepínání průtoků mobilní fáze pomocí ventilů. Výhodou těchto modulátorů jsou nízké pořizovací a provozní náklady, avšak produkují širší píky, tudíž nedosahují tak vysoké účinnosti oproti kryogenním modulátorům.¹⁵

Pulsní tlakový modulátor využívá k zachycení části eluentu z první kolony do skladovací kapiláry tlakových změn nosného plynu v pomocných kapilárách. Je sestaven ze skladovací kapiláry a dvou pomocných kapilár, které jsou propojeny pomocí dvou spojovacích prvků. Část vzorku eluujícího z první kolony je zachycena ve skladovací kapiláře. Na krátký časový úsek (stovky milisekund) prochází plyn první pomocnou kapilárou a tímto tlakovým pulzem nadávkuje nashromážděný vzorek ze skladovací kapiláry do druhé kolony. Po zbytek modulační periody (jednotky sekund) proudí plyn druhou pomocnou kapilárou do druhé kolony a zásobuje ji tak mobilní fází. Regulace tlaku v kapilárách je řízena pomocí jednotky umístěné mimo termostat.¹⁶



Obrázek 2.4.1: Schéma plynového chromatografu s pulzním tlakovým modulátorem s FID a MS detekcí (upraveno podle Murray J. A.¹⁷)

2.5 Detekce

V důsledku modulace a tím velmi rychlé separace na druhé koloně jsou výsledkem separace velmi úzké píky o šířce 100 až 500 ms při základně. Proto pro správné zobrazení GC×GC chromatogramů systém vyžaduje rychlé detektory o frekvenci snímání alespoň 100 Hz. Vhodným detektorem je plamenově-ionizační detektor (FID), který dokáže sbírat data ve frekvencích 50-300 Hz.¹⁸ Jeho nevýhodou je nižší citlivost a skutečnost, že nedokáže poskytnout strukturní informace o analytech, tudíž se hodí pouze ke kvantifikaci. Naproti tomu hmotnostní spektrometr dokáže poskytnout kvalitativní a strukturní informace o analytech. Klasický kvadrupól však nemá tak rychlý sběr dat (20 Hz), a proto se musí zvolit buď užší rozsah měřených hodnot m/z či jiný analyzátor.¹⁹ Nejvhodnějším analyzátozem pro GC×GC je TOF-MS, který dokáže získat 50 a více hmotnostních spekter za sekundu, což je dostatečné pro vhodné zobrazení GC×GC chromatogramů, a tak identifikaci a kvantifikaci.²⁰

2.6 Využití

GC×GC je mocný a všestranný analytický nástroj, který má široký rozsah využití a našel své uplatnění v mnoha oborech díky svým výhodám oproti běžné 1D-GC. Nejčastěji se využívá jeho spojení s TOF-MS detekcí.²¹ Tato technika je vhodná pro analýzu velmi komplexních vzorků, jako jsou petrochemické vzorky, benzín, ropa, petrolej a oleje, které obsahují velké množství nasycených i nenasycených uhlovodíků.²² Hojně se využívá v oblasti životního prostředí pro stanovení složek zemin a sedimentů,²³ těkavých organických látek a polutantů v ovzduší nebo pro stanovení pesticidů v ovoci a zelenině.²⁴ GC×GC je také možno využít pro analýzu biologických vzorků, kde je potřeba vysoké citlivosti a specifčnosti detekce, jako jsou např. cílené analýzy drog nebo anti-dopingové kontroly pro stanovení steroidů obsažených ve vzorku moči.²⁵

Využívá se také pro analýzu vůní a esenciálních olejů se složitou matricí a vysokou variabilitou stopových složek (ng/g), jejichž identifikace může být obtížná. Tyto oleje nejčastěji obsahují estery, alkoholy, terpeny a další uhlovodíky s podobnými vlastnostmi. S vhodnou GC×GC konfigurací je možné analyzovat těkavé látky a možné alergenů z vůní a olejů.²⁶

2.7 Levandulový olej

Levandule (*Lavandula angustifolia*) je aromatická a léčivá rostlina z čeledi hluchavkovitých využívána již od starověku. Většina druhů levandule jsou vysoce aromatické rostliny, které produkují esenciální oleje proměnlivého složení po téměř celé délce rostliny. Levandulový olej má řadu biologických aktivit; antibakteriální, protiplísňový a sedativní účinek. Uklidňuje nervové napětí, působí proti nespavosti, migréně a bolestem hlavy. Působí relaxačně na hladké svalstvo a je účinný proti nadýmání. Působí antisepticky, regeneruje buňky pokožky, je vhodný na popáleniny, odřeniny a hmyzí bodnutí. Je také známým repelentem - odpuzuje moly a působí i na vlasové vši.²⁷

V současnosti se přírodní olej používá v aromaterapii, parfumerii a kosmetickém průmyslu pro svoji jedinečnou vůni i jako antimikrobiální prostředek. Levandulová silice se získává pomocí destilace vodní parou z květů a listů polokeře 50 cm vysokého, rozšířeného po celé Evropě. Je to jedna z nejvíce vyráběných silic. Hlavními producenty levandulového oleje jsou v současnosti Francie, Bulharsko, Čína a Španělsko.²⁸

Nejvíce zastoupenou skupinou látek v rostlinných olejích jsou terpeny a terpenoidy. Terpeny jsou vonné organické sloučeniny. Jejich molekuly se skládají ze dvou nebo více isoprenových jednotek, dle jejich počtu se pak dále rozdělují. Terpenoidy jsou modifikované formy terpenů (hydroxylované, esterifikované nebo oxidované formy), které se vyskytují přirozeně v rostlině po oxidaci nebo přeskupení uhlíkového skeletu. Levandulový olej obsahuje především těkavé monoterpeny a seskviterpeny, které mohou být lineární, monocyklické nebo bicyklické uhlovodíky, alkoholy nebo ketony.²⁹ Hlavními složkami oleje jsou linalool, linalyl acetát, eukalyptol, β -ocimen, terpinen-4-ol a kafr. Jednotlivé oleje se od sebe odlišují zejména v poměru složek. Složení oleje se liší druh od druhu, ale i v rámci jednoho druhu podle místa pěstování, podmínek nebo sběru rostliny.³⁰

Nejvyžívanější technikou pro separaci složek esenciálních olejů je plynová chromatografie.³¹

V Tabulce 2.7.1 jsou uvedeny požadavky na složení esenciálního oleje z francouzské levandule podle Mezinárodní organizace pro standardizaci (ISO).

Tabulka 2.7.1: Požadavky na procentuální složení levandulového esenciálního oleje dle normy ISO 3515:1987

Složka	Obsahové zastoupení (%)	
	minimální	maximální
trans- β -ocimen	2	6
cis- β -ocimen	4	10
oktan-3-on	–	2
eukalyptol	–	1,5
limonen	–	0,5
kafr	–	0,5
linalool	25	38
linalyl acetát	25	45
terpinen-4-ol	2	6
lavandulol	0,3	–
lavandulyl acetát	2	–
α -terpineol	–	1

3 Experimentální část

3.1 Chemikálie

Éterické oleje obsahující levandulovou esenci značek Pajoma a Profissimo byly zakoupeny v drogerii (DM drogerie markt, Praha, leden 2015). Extrakt levandule byl poskytnut Gymnáziem a SOŠ pedagogickou v Liberci, kde byl proveden destilací vodní parou za dále nezjištěných podmínek.

3.2 Přístrojové vybavení

Byl použit plynový chromatograf Shimadzu GC-2010 (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) vybaven dvojicí nezávislých detektorů: plamenově ionizačním (FID) a hmotnostním (kvadrupól QP2010 Plus). K dávkování do plynového chromatografu byl použit autosampler AOC-20i (Shimadzu, Analytical and Measuring Instruments Division, Kyoto, Japonsko) se stříkačkou o objemu 10 µl (Hamilton, Reno, USA). Pro první dimenzi byla vybrána separační kolona Rxi-5Sil MS (ekvivalentní složení 95 % dimethylpolysiloxan – 5 % difenyl) délky 20 m, o vnitřním průměru 0,15 mm a 0,15 µm tloušťky filmu stacionární fáze (Restek, Bellefonte, PA, USA). Pro druhou dimenzi byla vybrána separační kolona Supelcowax 10 délky 2 m, o vnitřním průměru 0,25 mm a 0,25 µm tloušťky filmu stacionární fáze (Supelco, Bellefonte, PA, USA). Za druhou kolonou byl umístěn dělič toku (splitter) s dvojicí kapilár: 50 cm dlouhou a s vnitřním průměrem 0,1 mm do hmotnostního detektoru a 30 cm dlouhou a vnitřním průměrem 0,25 mm do FIDu. Pulsní tlakový modulátor skládající se z 35 cm dlouhé skladovací kapiláry, dvou 40 cm dlouhých pomocných kapilár a dvou trojcestných spojovacích prvků (SilFlow, SGE Analytical Science, Ringwood, Australia) byl umístěn mezi kolonami v plynovém chromatografu. Dva ventily (NResearch Inc., NJ, USA) a v laboratoři sestavená řídicí jednotka byla umístěna na plynovém chromatografu mimo temperovanou část.

3.3 Podmínky analýzy

Vstupní tlak na kolonu byl 250 kPa, první a druhý tlak nastavený na modulátoru byl 155 kPa a 175 kPa. Nosným plynem bylo helium (99,999%, Linde Technoplyn, Česká republika). Split dávkování (poměr 1:100), teplota injektoru 280 °C, teplota FIDu 300 °C, teplota transfer line do MS 220 °C, teplota iontového zdroje 200 °C. U plamenově ionizačního detektoru byla průtoková rychlost vzduchu 400 ml/min (stlačený vzduch), vodíku 40 ml/min (99,9% Linde Technoplyn, Česká republika) a make-up dusíku 20 ml/min (99,999% Linde Technoplyn, Česká republika). Hmotnostní detektor pracoval ve scan modu s frekvencí 50 Hz v rozsahu hmot 33–200 m/z.

Teplota temperované části plynového chromatografu se řídila podle následujícího teplotního programu: počáteční teplota 70 °C byla zvyšována rychlostí 2 °C/min na 150 °C a poté nechána izotermálně 10 min. Modulační perioda byla 5 s a doba pulzu 0,3 s.

Všechna níže uvedená data byla naměřena za těchto podmínek.

3.4 Vyhodnocení

Chromatogramy byly zaznamenány programem GCMS Solution (ver 2.53, Shimadzu, Japonsko) a transformace a vizualizace 2D grafů programem GC Image 2.0 (Zoex, Houston, USA). Identifikace byla provedena pomocí těchto dvou programů a spektra byla porovnávána s knihovnou spekter NIST 08 Mass Spectral library (NIST USA, formát Shimadzu).

V programu GC Image dochází k několikerému přeformátování dat (např. kompenzace nelinearity základní linie) a vytvoření 2D konturového chromatogramu. Spektrum daného analytu, které se porovnává s knihovnou, je výsledkem průměrování a korekce na šum základní linie z oblasti plochy uvnitř hranic daného bloku. Všechny tyto korekce a operace s daty nejsou v manuálech programu přesně popsány a probíhají podle nám neznámých algoritmů.

Program GCMS Solution pracuje se surovými daty 1D-GC×GC chromatogramu. Lze v něm označit jednotlivý modulovaný pík, obvykle v jeho maximu a odečíst od jeho spektra spektrum pozadí, tudíž pouze tato spektrální data označeného píku se porovnávají s knihovnou spekter.

4 Výsledky a diskuze

4.1 Optimalizace

Optimalizaci experimentálních parametrů nelze provést pokročilými statickými metodami, protože jednotlivé experimentální parametry jsou na sobě závislé (korelují) a vzájemně se ovlivňují (jsou neortogonální). Optimalizace GC×GC systému vyžaduje odlišný a více komplexní přístup než u 1D-GC. Byl tudíž zvolen klasický, empirický přístup „one factor at time“, kdy je studován vliv jednoho parametru na odezvu systému, přičemž všechny ostatní parametry jsou konstantní. Teplota a průtok nosného plynu ovlivní separaci v obou kolonách odlišně. Dále musí být zahrnuty nové parametry, jako je modulační perioda a tlaky v kolonách a kapilárách, které musí být optimalizovány.

Byly hledány optimální podmínky pro efektivní separaci éterických olejů. Vzorky byly analyzovány neředěné v čisté formě. Bylo zvoleno dávkování 1 µl ve split poměru 1:100. Množství vzorku přicházejícího na MS detektor bylo zvoleno tak, aby bylo dosaženo nejvyšší citlivosti detektoru a zároveň nesmělo být příliš vysoké, aby nedocházelo k jeho přetížení.

4.1.1 Volba tlaků

Vstupní tlak v plynovém chromatografu ovlivňuje průtokovou rychlost mobilní fáze v první a částečně i druhé koloně, měl by tedy být kompromisem mezi optimy obou kolon. V případě nízké lineární rychlosti dochází ke ztrátě separační účinnosti a prodloužení analýzy. Pro zachování modulace bylo potřeba dodržet několik zásad nastavení tlaku a objemového průtoku v kapilárách, a zároveň by měla být zachována optimální lineární průtoková rychlost během celé analýzy. V opačném případě přestane fungovat modulace a analýza probíhá jako běžná 1D-GC.

Tlak nastavený na první pomocné kapiláře modulátoru musel být dostatečně vysoký, aby během krátkého pulzu vypláchnul a nadávkoval analyt ze skladovací kapiláry do druhé kolony. Avšak pokud by byl tlak nastaven na hodnotu příliš vysokou, zastavil by nebo obrátil tok nosného plynu v první koloně.

Druhá pomocná kapilára zásobuje z větší části mobilní fázi kolonu v druhé dimenzi. Tato kolona má větší průměr než kolona první a vyžaduje tak vyšší průtok nosného plynu, aby separace proběhla dostatečně rychle v rámci modulační periody.

Zároveň však rozdíl tlaků vkládaných na pomocné kapiláry nesmí být příliš rozdílný, protože při větších rozdílech v průtokových objemech mezi kapilárami může docházet ke kolísání signálu na detektoru vlivem střídání velkého a malého průtokového objemu nosného plynu. Tím vzniká vysoký šum a klesá tak citlivost.

4.1.2 Modulační perioda

Pro zachování separace v první dimenzi musela být zvolena vhodná modulační perioda a musela být dodržena podmínka, že každý pík z první dimenze by měl být modulován alespoň třikrát. Modulační perioda by tedy neměla být příliš dlouhá, jelikož při modulační periodě 8 s a více docházelo k nedostatečné modulaci některých píků. Vznikaly tak rozmyté bloby, které nebyly dostatečně rozlišeny a píkova kapacita klesala. Separační prostor (plocha 2D-chromatogramu využitelná pro separaci) se tímto sice zvýšil, ale nebyl využit v důsledku krátkých retenčních časů analytů na druhé koloně. Zároveň by však modulační perioda měla být delší než retenční čas látek ve druhé koloně, jinak analyty nestihnou eluovat v rámci jedné modulační periody a dochází k jevu zvanému wrap-around (přetočení, přeběhnutí). Na blobech zobrazených pod základní linií je wrap-around patrný, ale nenarušil strukturu chromatogramu, protože se bloby zobrazily v mrtvém čase druhé kolony, a nedošlo tak ke koeluci s analyty z následujícího cyklu. Bylo výhodnější zvolit kratší modulační periodu a počítat s tímto efektem než zvolit delší modulační periodu a prodlužovat tak délku analýzy. Tento wrap-around by bylo možné eliminovat v případě využití vlastního termostatovaného prostoru pro druhou kolonu. Při užití vyšší teploty druhé kolony by došlo ke zrychlení separace a zkrácení retenčních časů analytů, které by eluovaly ve správné modulační periodě.

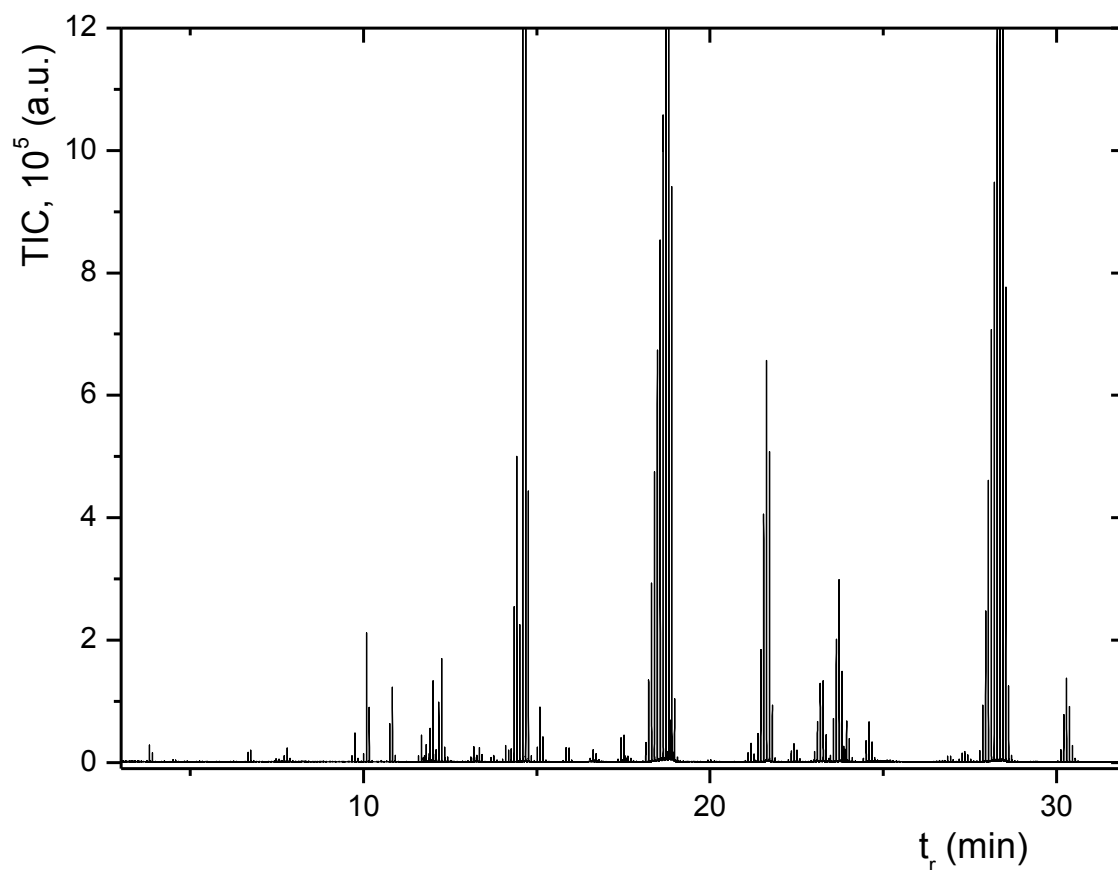
Dále musí být zvolena správná délka pulzu. Při každém pulzu dochází na okamžik k zastavení analýzy v první koloně, tudíž s rostoucí délkou pulzu se při stejné modulační periodě prodlužuje celková doba analýzy. Zároveň délka pulzu musí být dostatečně dlouhá, aby došlo k úplnému vypláchnutí skladovací kapiláry.

4.1.3 Teplotní program

Byly vyzkoušeny různé teplotní programy. Pro GC×GC analýzu je vhodný pomalejší teplotní program, který je ovšem na úkor délky analýzy. Ukázalo se, že při optimálních separačních podmínkách měl teplotní program největší vliv na kvalitu separace. Jako optimum bylo nalezeno zvyšování teploty rychlostí 2 °C/min a čas analýzy 50 min. Při zvolení vyšší rychlosti docházelo ke snížení separační účinnosti a rozmývání blobů. Volba teploty má zároveň vliv na průtok nosného plynu. Při vyšších teplotách v teplotním programu docházelo k rozmývání blobů, nejspíše vlivem snížení průtoku nosného plynu a tím k vyššímu příspěvku difuze.

4.2 Levandulové oleje

Byla provedena analýza éterických olejů a levandulového oleje za nalezených optimálních podmínek (Kapitola 3.3). Na obrázku 4.2.1 je příklad 1D-GC×GC chromatogramu éterického oleje, na kterém jsou vidět velmi úzké modulované píky.



Obrázek 4.2.1: 1D-GC×GC chromatogram éterického oleje. Podmínky analýzy: Vstupní tlak na kolonu byl 250 kPa, první a druhý tlak nastavený na modulátoru byl 155 kPa a 175 kPa. Teplota kolon se řídila podle následujícího teplotního programu: počáteční teplota 70 °C byla zvyšována rychlostí 2 °C/min na 150 °C a poté nechána izotermálně 10 min. Modulační perioda byla 5 s a doba pulzu 0,3 s.

Na obrázku 4.2.2 je konturový chromatogram éterického oleje, na obrázku 4.2.3 pak levandulového extraktu. Do konturových grafů vyexportovaných z programu GC Image byla vložena šedá čára představující základní linii mrtvého času druhé kolony. Na ose x je retenční čas na první koloně v minutách, na ose y retenční čas na druhé koloně v sekundách. Barva určuje intenzitu signálu tak, že světle modrá je signál roven nule a přes tmavě modrou, fialovou až ke žluté, kdy je signál největší.

V první dimenzi byla použita nepolární kolona a látky se separovaly především podle jejich bodu varu. Čím více byla látka těkavější, tím méně byla na první koloně zadržována a tím kratší byl její retenční čas v první dimenzi. Na ose x tedy můžeme vidět seřazení látek podle stoupajícího bodu varu. V druhé dimenzi byla použita polární kolona a látky se separovaly především dle jejich polarit. Čím více byla látka polární, tím více byla zadržována na druhé koloně a tím delší byl její retenční čas v druhé dimenzi. Na ose y by bylo možné vidět řazení analytů dle jejich polarit. Ovšem na nejvíc polárních analytech je viditelný wrap-around, atak se bloby těchto analytů zobrazily v mrtvém čase druhé kolony. V konturovém chromatogramu je naznačena šedá čára představující základní linii, bloby zobrazené pod ní podléhají wrap-around efektu. Analyty byly identifikovány podle jejich hmotnostních spekter z MS detektoru v programech GC Image a GCMS Solution. U každého analytu je uvedena procentuální shoda spekter s knihovnou NIST z obou programů.

V programu GC Image dochází k několikerému přeformátování dat a vytvoření 2D konturového chromatogramu. Spektrum daného analytu, které se porovnává s knihovnou, je výsledkem průměrování a korekce na šum základní linie z oblasti plochy uvnitř hranic daného blobu. Program GC Image zřejmě blíže nezjištěným způsobem přepočítává a upravuje data, takže v některých případech dochází ke ztrátě části informace důležité pro správnou identifikaci látek. Tento proces je ze strany obsluhy neovlivnitelný a je neoddelitelnou vlastností programu. Je možné, že v nových verzích programu je tento efekt opraven. Shoda spektrálních dat s knihovnou je tak někdy velmi nepřesná a nízká, a nedá se na identifikaci tímto programem příliš spoléhat. Je vhodnější spíše pro vizualizaci a případnou transformaci do 3D zobrazení.

Pro identifikaci byl zvolen také přesnější program GC MS Solution, který pracuje se surovými daty 1D-GC×GC chromatogramu. Lze v něm označit jednotlivý modulovaný pík, obvykle v jeho maximu a odečíst od jeho spektra spektrum pozadí,

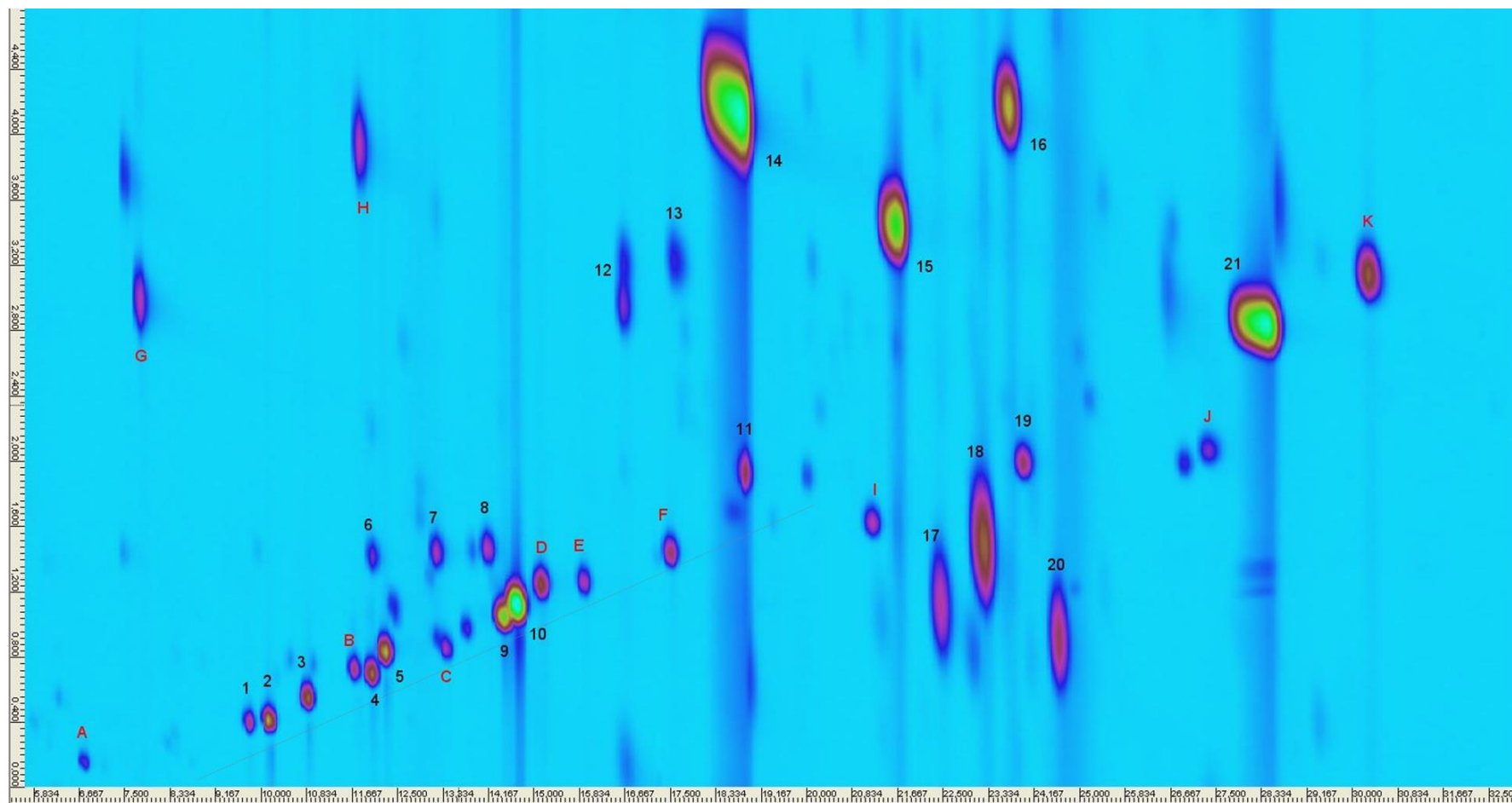
tudíž pouze tato spektrální data označeného píku se porovnávají s knihovnou spekter. Identifikace je tak přesnější a procentuální shoda s knihovnou mnohem vyšší.

V tabulce 4.2.1 jsou analyty obsažené v éterickém oleji i v levandulovém extraktu a na konturových grafech jsou označeny čísly. V tabulce 4.2.2 jsou analyty obsažené pouze v éterickém oleji a v tabulce 4.2.3 jsou analyty obsažené pouze v levandulovém extraktu. Tyto bloby jsou značeny písmeny.

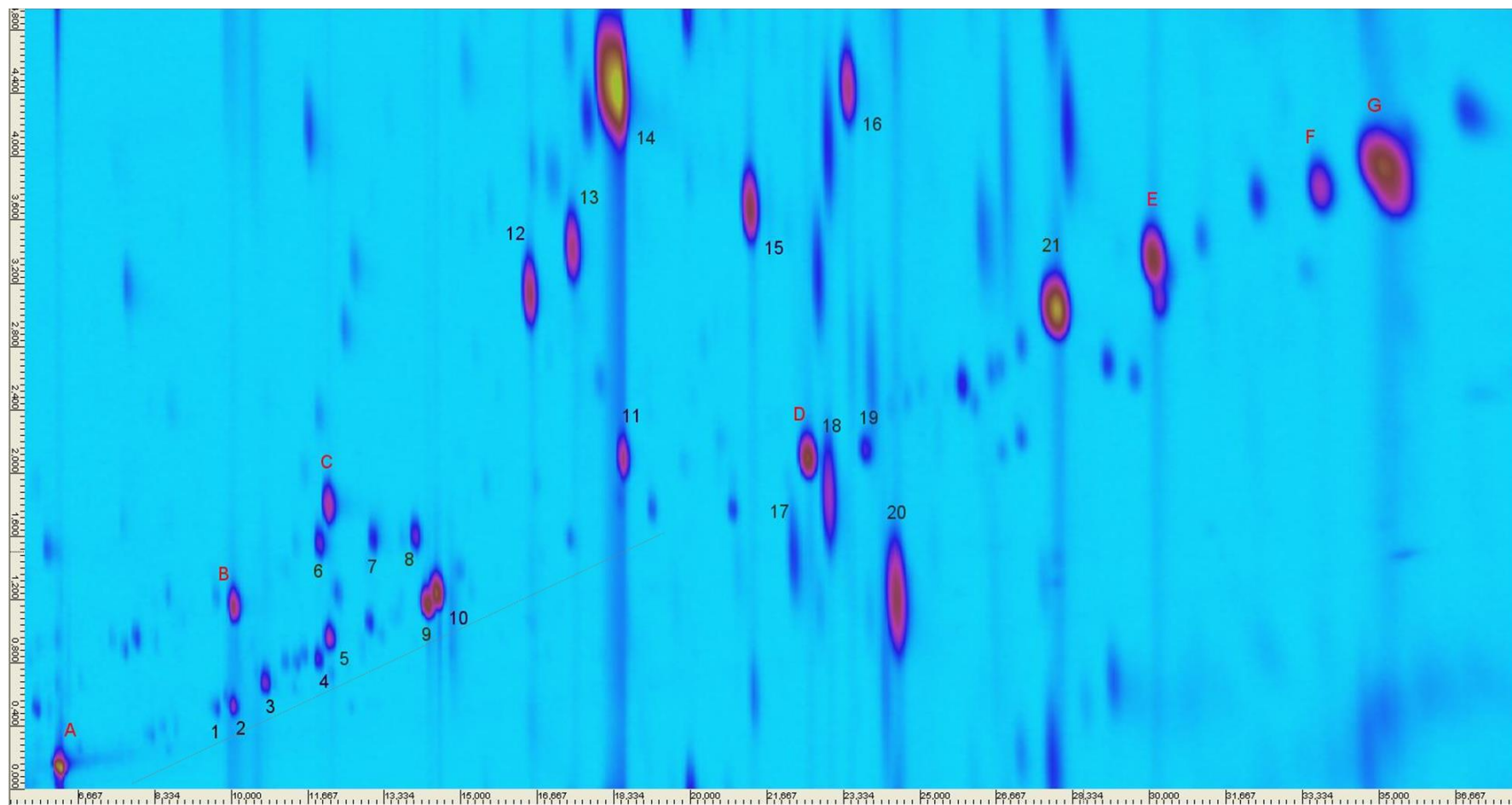
Nejvíce zastoupenou skupinou látek byly terpeny:

- Monoterpeny: Kamfen, Limonen, Myrcen, Ocimen, α - a β -Pinen, Sabinen
- Monoterpenické alkoholy: Borneol, Linalool, Terpinen-4-ol, Terpeneol, Lavandulol
- Terpenické estery: Lavandulyl acetát, Linalyl acetát, α - a β -Terpinyl acetát
- Terpenoidy:
 - ketony: Kafr, 3-Oktanon, α -Thujen
 - ether: Eukalyptol
- Estery: Hexyl acetát, Okten-1-ol acetát, Hexyl butanoát, Ethyl-acetát, Hexyl isovalerát

Zastoupení látek v obou éterických olejích bylo téměř totožné, a tak jsou zde uvedeny výsledky analýzy pouze jednoho. S největší pravděpodobností se jedná o stejného výrobce, který pro výrobu používá stejný druh levandule. V éterickém oleji jsou zastoupeny všechny látky podle normy ISO 3515:1987 (Tabulka 2.7.1). Ze zbarvení konturových blobů můžeme usuzovat, že ve vzorku éterického oleje byly nejvíce zastoupeny látky: linalool, kafr, linalyl acetát. V případě přírodního extraktu byly nejvýraznějšími bloby látek: linalool, linalyl acetát, terpinyl acetát. Rozdílné zastoupení jednotlivých složek éterického oleje a extraktu může mít více příčin. Může se jednat o rozdílné druhy levandule, různý způsob kultivace a pěstování v odlišných podmínkách. Vliv na složení má také způsob destilace a přípravy oleje nebo to, z jakých částí rostliny byl olej extrahován.



Obrázek 4.2.2: Konturový GC×GC chromatogram éterického levandulového oleje. Podmínky analýzy stejné jako obrázek 4.2.1.



Obrázek 4.2.3: Konturový GC×GC chromatogram levandulového extraktu. Podmínky analýzy stejné jako obrázek 4.2.1.

Tabulka 4.2.1: Analyty zastoupené v éterickém oleji (Obrázek 4.2.2) i extraktu (Obrázek 4.2.3)

Číslo bloku	Analyt	Shoda s knihovou dle hmotnostních spekter (%)			
		Éterický olej		Extrakt	
		GCMS solution	GC Image	GCMS solution	GC Image
1	α -Thujen	96	7	92	nenalezeno
2	α -Pinen	97	16	95	3
3	Kamfen	95	24	95	7
4	β -Pinen	97	50	95	3
5	β -Myrcen	95	33	95	20
6	3-Oktanon	95	10	95	1
7	Hexyl acetát	97	46	96	nenalezeno
8	o-Cymen	95	19	95	11
9	Limonen	94	24	94	18
10	Eukalyptol	95	87	95	83
11	Okten-1-ol acetát	92	57	91	56
12	Cis-linalool oxid	95	59	96	55
13	Trans-linalool oxid	95	21	96	25
14	Linalool	96	93	96	91
15	Kafr	96	38	96	69
16	Terpinen-4-ol	95	48	94	46
17	Lavandulol	95	26	93	nenalezeno
18	Borneol	96	40	96	29
19	n-Hexyl butanoát	95	80	94	4
20	Terpineol	92	58	93	68
21	Linalyl acetát	95	21	95	17

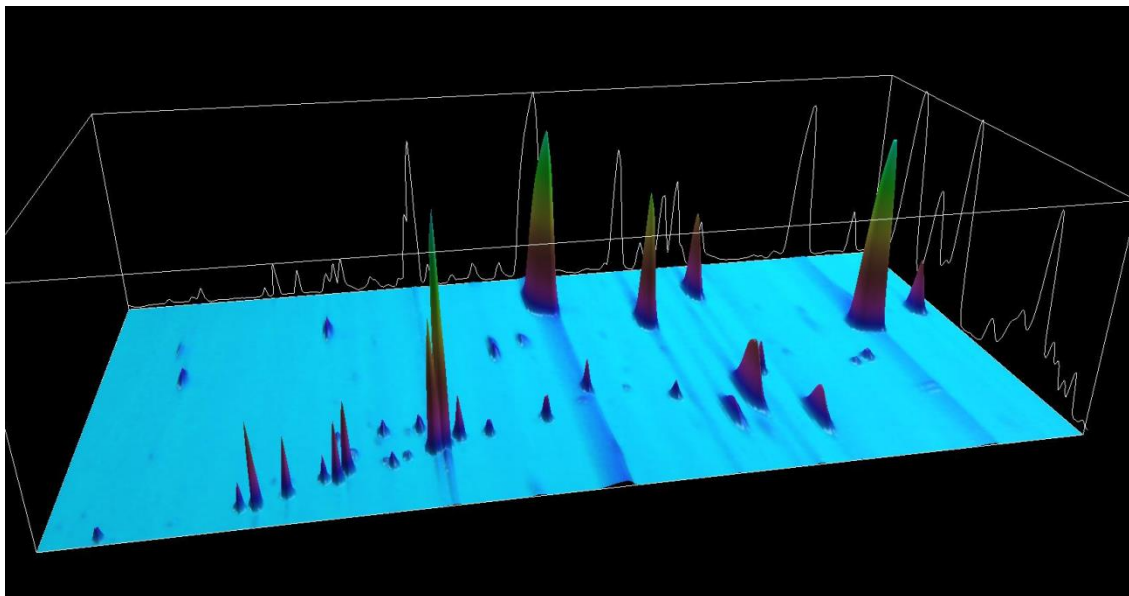
Tabulka 4.2.2: Analyty zastoupené pouze v éterickém oleji (Obrázek 4.2.2)

Označení bloku	Analyt	Shoda s knihovou dle hmotnostních spekter (%)	
		GCMS solution	GC Image
A	1-Methoxy-hexan	97	24
B	Sabinen	96	21
C	3-Karen	95	7
D	β -Ocimen	96	15
E	4-Karen	92	12
F	Terpinolen	96	21
G	1-Hexanol	96	15
H	Okten-3-ol	98	69
I	Hexyl butanoát	92	47
J	Hexyl isovalerát	93	65
K	Lavandulyl acetát	95	40

Tabulka 4.2.3: Analyty zastoupené pouze v levandulovém extraktu (Obrázek 4.2.3)

Označení bloku	Analyt	Shoda s knihovou dle hmotnostních spekter (%)	
		GCMS solution	GC Image
A	Ethyl-acetát	88	97
B	5-Methyl-3-heptanon	95	70
C	2-Oktanon	96	42
D	Isononyl acetát	94	84
E	β -Terpinyl acetát	93	30
F	1,6-Dihydrokarveol	91	5
G	α -Terpinyl acetát	93	56

Pro názornost byl konturový graf éterického oleje (obrázek 4.2.2) převeden do 3D modelu (obrázek 4.2.4), kdy retenční časy na kolonách zůstaly na osách x a y . Na ose z je intenzita signálu. Průmětem kuželů do plochy x - y ze směru z vznikají bloby a obráceně. Tato 3D zobrazení slouží většinou pouze pro názornou ilustraci. Průměty do ploch x - z a y - z představují hypotetické 1D chromatogramy, jak by vypadaly v případě analýz pouze na první a druhé koloně. Je patrné, že ani jedna kolona není schopna samostatně za daných podmínek účinně rozlišit většinu složek vzorku.



Obrázek 4.2.4: 3D GC \times GC chromatogram éterického oleje

5 Závěr

- Byly nalezeny optimální podmínky pro efektivní separaci éterických olejů pomocí komprehenzivní plynové chromatografie s pulzním tlakovým modulátorem:
 - Tlakové: vstupní tlak na kolonu byl 250 kPa, první a druhý tlak nastavený na modulátoru byl 155 kPa a 175 kPa.
 - Teplotní: počáteční teplota 70 °C byla zvyšována rychlostí 2 °C/min na 150 °C a poté nechána izotermálně 10 min.
 - Modulační perioda byla 5 s a doba pulzu 0,3 s.
- Za těchto podmínek byla provedena analýza dvou éterických levandulových olejů a extraktu z levandule.
- V první dimenzi byla použita nepolární kolona a látky se separovaly především podle jejich bodu varu. V druhé dimenzi byla použita polární kolona a látky se separovaly především podle jejich polarit.
- Analyty byly identifikovány podle jejich hmotnostních spekter z MS detektoru. Výrazně vyšší shoda spekter s databází NIST byla zjištěna u programu GCMS Solution, který se proto jeví vhodnějším programem pro identifikaci. V tomto programu lze zobrazit spektrum daného modulovaného píku analytu (surová data). Program GC Image zřejmě blíže nezjištěným způsobem přepočítává a upravuje data, takže v některých případech dochází ke ztrátě části informace důležité pro správnou identifikaci látek. Je vhodnější spíše pro vizualizaci a případnou transformaci do 3D zobrazení.
- Celkem bylo identifikováno 39 látek s pravděpodobnostmi shody spekter od 88 do 98 % (průměr 95 %, medián 95 %) v programu GCMS Solution a od 1 do 97 % (průměr 36 %, medián 28 %) v programu GC Image.

- Nejvíce zastoupenými látkami v levandulových olejích byly terpeny.
- Podle konturových chromatogramů byly ve vzorku éterického oleje nejvíce zastoupeny látky: linalool, kafr, linalyl acetát. V případě přírodního levandulového extraktu byly nejvýraznější bloby látek: linalool, linalyl acetát, terpinyl acetát.
- Rozdíly v zastoupení jednotlivých látek v levandulových olejích mohou záležet na druhu levandule, podmínkách pěstování i způsobu přípravy oleje.

6 Literatura

1. Seeley, J. V.: Recent advances in flow-controlled multidimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1255**, 24-37 (2012).
2. Tranchida, P. Q.; Sciarrone, D.; Dugo, P.; Mondello, L.: Heart-cutting multidimensional gas chromatography: a review of recent evolution, applications, and future prospects. *Analytica Chimica Acta* **716**, 66-75 (2012).
3. Marriott, P.; Shellie, R.: Principles and applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **21**, 573-583 (2002).
4. Edwards, M.; Mostafa, A.; Gorecki, T.: Modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography: 20 years of innovation. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **401**:8, 2335-49 (2011).
5. Górecki, T.; Harynuk, J.; Panić, O.: The evolution of comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). *Journal of Separation Science* **27**:5-6, 359-379 (2004).
6. Reichenbach, S. E.; Ni, M.; Kottapalli, V.; Visvanathan, A.: Information technologies for comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **71**:2, 107-120 (2004).
7. Matos, J. T. V.; Duarte, R. M. B. O.; Duarte, A. C.: Trends in data processing of comprehensive two-dimensional chromatography: State of the art. *Journal of Chromatography B* **910**, 31-45 (2012).
8. Harynuk, J.; Górecki, T.: Flow model for coupled-column gas chromatography systems. *Journal of Chromatography A* **1086**:1-2, 135-140 (2005).
9. Mostafa, A.; Edwards, M.; Górecki, T.: Optimization aspects of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1255**, 38-55 (2012).
10. Dallüge, J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography: a powerful and versatile analytical tool. *Journal of Chromatography A* **1000**:1-2, 69-108 (2003).
11. Adahchour, M.; Beens, J.; Vreuls, R. J. J.; Brinkman, U. A. T.: Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC×GC). *Trends in Analytical Chemistry* **25**:5, 438-454 (2006).
12. Khummueng, W.; Harynuk, J.; Marriott, P. J.: Modulation Ratio in Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography. *Analytical Chemistry* **78**, 4578-4587 (2006).
13. Pursch, M.; Eckerle, P.; Biel, J.; Streck, R.; Cortes, H.; Sun, K.; Winniford, B.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography using liquid nitrogen modulation: set-up and applications. *Journal of Chromatography A* **1019**:1-2, 43-51 (2003).

14. Begnaud, F.; Debonneville, C.; Probst, J. P.; Chaintreau, A.; Morrison, P. D.; Adcock, J. L.; Marriott, P. J.: Effects of variation in modulator temperature during cryogenic modulation in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Separation Science* **32**:18, 3144-51 (2009).
15. Semard, G.; Gouin, C.; Bourdet, J.; Bord, N.; Livadaris, V.: Comparative study of differential flow and cryogenic modulators comprehensive two-dimensional gas chromatography systems for the detailed analysis of light cycle oil. *Journal of Chromatography A* **1218**:21, 3146-52 (2011).
16. Tranchida, P. Q.; Franchina, F. A.; Dugo, P.; Mondello, L.: Use of greatly-reduced gas flows in flow-modulated comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* **1359**, 271-6 (2014).
17. Murray, J. A.: Qualitative and quantitative approaches in comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1261**, 58-68 (2012).
18. Marriott, P. J.; Chin, S. T.; Maikhunthod, B.; Schmarr, H. G.; Bieri, S.: Multidimensional gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* **34**, 1-21 (2012).
19. Mondello, L.; Tranchida, P. Q.; Dugo, P.; Dugo, G.: Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review. *Mass Spectrometry Reviews* **27**:2, 101-24 (2008).
20. Dallüge, J.; Vreuls, R. J. J.; Beens, J.; Brinkman, U. A. T.: Optimization and characterization of comprehensive two-dimensional gas chromatography with time-of-flight mass spectrometric detection (GC×GC-TOF MS). *Journal of Separation Science* **25**, 201-214 (2002).
21. Adahchour, M.; Beens, J.; Brinkman, U. A.: Recent developments in the application of comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Journal of Chromatography A* **1186**:1-2, 67-108 (2008).
22. von Muhlen, C.; Zini, C. A.; Caramao, E. B.; Marriott, P. J.: Applications of comprehensive two-dimensional gas chromatography to the characterization of petrochemical and related samples. *Journal of Chromatography A* **1105**:1-2, 39-50 (2006).
23. Mao, D.; Lookman, R.; Van De Weghe, H.; Vanermen, G.; De Brucker, N.; Diels, L.: Aqueous solubility calculation for petroleum mixtures in soil using comprehensive two-dimensional gas chromatography analysis data. *Journal of Chromatography A* **1216**:14, 2873-80 (2009).
24. Tranchida, P. Q.; Donato, P.; Cacciola, F.; Beccaria, M.; Dugo, P.; Mondello, L.: Potential of comprehensive chromatography in food analysis. *Trends in Analytical Chemistry* **52**, 186-205 (2013).
25. Silva, A. I., Jr.; Pereira, H. M.; Casilli, A.; Conceicao, F. C.; Aquino Neto, F. R.: Analytical challenges in doping control: Comprehensive two-dimensional gas chromatography with time of flight mass spectrometry, a promising option. *Journal of Chromatography A* **1216**:14, 2913-22 (2009).

26. Cordero, C.; Bicchi, C.; Joulain, D.; Rubiolo, P.: Identification, quantitation and method validation for the analysis of suspected allergens in fragrances by comprehensive two-dimensional gas chromatography coupled with quadrupole mass spectrometry and with flame ionization detection. *Journal of Chromatography A* **1150**:1-2, 37-49 (2007).
27. Cavanagh, H. M.; Wilkinson, J. M.: Biological activities of lavender essential oil. *Phytotherapy research* **16**:4, 301-8 (2002).
28. Lesage-Meessen, L.; Bou, M.; Sigoillot, J. C.; Faulds, C.; Lomascolo, A.: Essential oils and distilled straws of lavender and lavandin: a review of current use and potential application in white biotechnology. *Applied Microbiology and Biotechnology* **99**:8, 3375-3385 (2015).
29. Benabdelkader, T.; Guitton, Y.; Pasquier, B.; Magnard, J. L.; Jullien, F.; Kameli, A.; Legendre, L.: Functional characterization of terpene synthases and chemotypic variation in three lavender species of section *Stoechas*. *Physiologia Plantarum* **153**:1, 43-57 (2015).
30. Kara, N.; Baydar, H.: Determination of lavender and lavandin cultivars (*lavandula* sp.) containing high quality essential oil in isparta, Turkey. *Turkish Journal of Field Crops* **18**:1, 58-65 (2013).
31. Marriotta, P. J.; Shelliea, R.; Cornwell, C.: Gas chromatographic technologies for the analysis of essential oils. *Journal of Chromatography A* **936**, 1-22 (2001).